

А. Александров, асп., В. Конопельнюк, канд. биол. наук,
И. Компанець, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины,
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПУТЬ БИОСИНТЕЗА СЕРОТОНИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ, ВЫЗВАННОГО ДЛИТЕЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ПРОГЕСТЕРОНА

Ожирение является самой распространённой проблемой со здоровьем. Серотонинергическая система мозга участвует в нейро-эндокринной регуляции, а также в регуляции ряда поведенческих функций организма. Серотонин является медиатором аминной природы, который одновременно выступает в роли нейротрансмиттера и тканевого гормона. Наибольшее количество серотонина синтезируется в головном мозге и 12-перстной кишке. В качестве нейротрансмиттера серотонин влияет как прямо, так и опосредованно на функции большинства клеток головного мозга. На функционирование серотонина влияет женский половой гормон прогестерон. Одним из эффектов прогестерона есть то, что он вызывает увеличение массы жировой ткани во время беременности. Длительное употребление прогестерона при гормонзаместительной терапии или в составе средств контрацепции также приводит к увеличению массы тела за счёт жировой ткани.

В данной работе были определены уровни активности ферментов серотонинергической системы – триптофан гидроксилазы, триптофан декарбоксилазы, моноаминоксидазы (МАО) и концентрации триптофана, 5-гидрокситриптофана, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты в мозге крыс в условиях ожирения, вызванного длительным введением прогестерона. Исследования показали, что содержание триптофана, 5-гидрокситриптофана, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты в мозге крыс в условиях ожирения, вызванного длительным введением прогестерона, увеличилось по сравнению с крысами контрольной группы. Уровни активности триптофан гидроксилазы и МАО уменьшились, а уровни активности триптофан-декарбоксилазы – увеличилась в мозге крыс в условиях ожирения, вызванного длительным введением прогестерона. Таким образом, в результате проведенных исследований, нами установлено дисбаланс в системе метаболизма серотонина в головном мозге крыс при развитии гормонального ожирения, индуцированного длительным введением прогестерона, что может свидетельствовать о привлечении функционирования серотонинергической нейротрансмиттерной системы в механизмы развития ожирения и сопутствующих заболеваний.

Ключевые слова: ожирение, прогестерон, серотонин.

Aleksandrov, PhD stud., V. Konopelniuk, PhD., I. Kompanets, PhD., L. Ostapchenko, Dr. Sc.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

PATHWAY IN RAT BRAINS UNDER EXPERIMENTAL OBESITY CAUSED LONG-TERM PROGESTERONE ADMINISTRATION

Obesity is one of the most common complex health problem. The pathway of serotonin synthesis takes part in neuroendocrine regulation, as well as in the regulation of a number of behavioral functions of the body and fat deposition. Serotonin is a mediator of the amine nature, which functions as a neurotransmitter and tissue hormone. The greatest amount of serotonin is synthesized in the brain and 12 duodenum. As a neurotransmitter, serotonin affects both directly and indirectly on the function of most brain cells. Female hormone progesterone influence on serotonin functions. One of the effect of progesterone is increasing of amount of fat tissue during the pregnancy. Long-term using of progesterone in hormone substitution therapy or as part of contraception also lead to fat accumulation effect.

The levels of activity of serotonergic system enzymes, tryptophan hydroxylase, tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase (MAO), and tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations in the rat brain under obesity conditions caused by prolonged administration of progesterone were determined in this study. Studies have shown that the content of tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain of rats under obesity caused by prolonged administration of progesterone increased in comparison with the rats of the control group. The levels of tryptophan hydroxylase and MAO activity decreased, and tryptophan decarboxylase activity levels increased in the rat brain under obesity conditions caused by prolonged administration of progesterone. Thus, as a result of our studies, we found an imbalance in the system of serotonin metabolism in the brain of rats with the development of hormonal obesity induced by prolonged administration of progesterone, which may indicate the involvement of the serotonergic neurotransmitter system in the mechanisms of the development of obesity and concomitant diseases.

Key words: obesity, progesterone, serotonin.

УДК 577.12+616.379+616.831

Т. Царенко, асп., Н. Ракша, канд. биол. наук, О. Кравченко, канд. биол. наук
ННЦ "Институт биологии та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МАТРИКСНІ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ У ПАТОГЕНЕЗІ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ, УСКЛАДНЕНОГО ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ II ТИПУ

Цинк-залежні матриксні металопротеїнази (ММП) активно залучені у процеси ремоделювання екстрацелюлярного матриксу. Представники желатиназ, зокрема желатиназа А чи ММП-2 (72 кДа) і желатиназа В або ММП-9 (92 кДа) відіграють виключно важливу роль під час розвитку низки гострих і хронічних патологічних станів, зокрема, серцево-судинних захворювань. Визначення особливостей функціонування та регуляції матриксних металопротеїназ дозволять не лише розширити існуючі уявлення щодо патогенетичних основ розвитку і прогресування цих захворювань, але й обґрунтувати і запровадити у медичну практику нові методи діагностики та лікування цих патологій. Метою дослідження було проаналізувати вміст, а також оцінити присутність активних форм ММП-9 і ММП-2 у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо і ішемічним інсультом, ускладненим цукровим діабетом II типу. У ході проведених досліджень виявлено, що гостра фаза ішемічного інсульту супроводжується значною зміною вмісту досліджуваних металопротеїназ у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп. У пацієнтів з ішемічним інсультом, ускладненим цукровим діабетом II типу, зміни вмісту ММП-2 і ММП-9 та їхня активність були більш вираженими порівняно із результатами пацієнтів з ішемічним інсультом. Згідно з даними ензим-електрофорезу, для гострого періоду інсульту, незалежно від наявності в анамнезі цукрового діабету, характерна присутність у сироватці крові латентних і активованих форм ММП-2 та ММП-9. Так, чітко видно смуги протеолітичної активності, що за молекулярною масою відповідають про-ММП-9 (92 кДа) та ММП-9 (85 кДа). Аналогічна картина спостерігається і у випадку ММП-2 – сироватка крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету містить 72 кДа проММП-2 та активовану ММП-2, молекулярна маса якої становить 67 кДа.

Ключові слова: ішемічний інсульт, цукровий діабет II типу, матриксні металопротеїнази.

Вступ. Одним із найсерйозніших викликів у сфері здоров'я для сучасного соціуму є хронічна гіперглікемія, яка розвивається внаслідок порушень секреції чи меха-

нізму дії інсуліну або обох цих чинників. Група метаболічних (обмінних) захворювань із цим симптомом, яку також називають цукровим діабетом, супроводжується

біохімічними змінами, ураженням, дисфункцією і недостатністю у роботі різних органів та систем. За сучасною класифікацією виділяють цукровий діабет I та II типів. Останній є найпоширенішою формою і у минулому називався інсулінонезалежним діабетом або діабетом людей похилого віку. У таких хворих спостерігається резистентність до інсуліну і зазвичай відносна (частіше, ніж абсолютна) недостатність цього гормону. Більшість хворих із даною формою мають ожиріння, що також сприяє виникненню інсулінорезистентності. Ця форма цукрового діабету часто залишається недіагностованою, а відтак некомпенсованою впродовж багатьох років, оскільки гіперглікемія розвивається поступово. Проте такі хворі перебувають у групі підвищеного ризику розвитку макро-, мікросудинних та неврологічних ускладнень, провідне місце серед яких належить ішемічному інсульту. Таким чином, цукровий діабет визнаний незалежним чинником ризику гострих порушень мозкового кровообігу і розцінюється як другий за значущістю після артеріальної гіпертензії. Так, за даними численних досліджень, наявність цукрового діабету підвищує ризик мозкового інсульту серед чоловіків у 1,5–4 рази, серед жінок – у 2–6 разів. У свою чергу, у кожного третього-п'ятого пацієнта із порушеннями мозкового кровообігу визначається цукровий діабет, причому останній нерідко діагностують уперше лише під час госпіталізації із приводу інсульту. Наявність цукрового діабету значно обтяжує перебіг ішемії тканин мозку, підвищує ризик смерті та несприятливо впливає на прогноз перебігу захворювання. Зазначимо, що частота повторних інсультів у цих хворих підвищується майже вдвічі порівняно із показником в основній популяції. При цьому на сьогодні наявна значна кількість результатів наукових досліджень щодо особливостей біохімічних процесів як за умов цукрового діабету (зокрема, ендокринні зміни, наслідки глюкозотоксичності із кетоацидозом, атерогенні дисліпідемії на фоні зростання вмісту вільних жирних кислот та їх окиснених форм, прозапальні реакції із дисбалансом адипокінів і окисно-відновних процесів [1]), так і за інсульту (головним чином – запальні прояви в осередку ішемії, зміни концентрації інтерлейкінів, порушення кальцієвого, глутаматного та NO гомеостазу [2]), що на фоні втрати адекватного нейронального контролю призводить до генералізації процесів розбалансування біохімічних та фізіологічних реакцій організму в цілому. Відтак, якщо про патологічні характеристики гострої фази порушення церебрального кровопостачання та умов гіперглікемії вже багато відомо, то про їх одночасну комбінацію, а тим більше про механізми реперфузії, відновлення та одужання після інсульту на фоні цукрового діабету досліджень значно менше. Однак, не виникає сумнівів, що саме процеси ремодуляції інфарктної ділянки мозку після інсульту матимуть вирішальне значення для позитивного прогнозу перебігу захворювання і саме ці процеси є порушеними за умови наявності цукрового діабету [3].

Останнім часом велика увага при дослідженні вищезазначених питань відводиться ферментам перебудови екстрацелюлярного матриксу, чільне місце серед яких належить матриксним металопротеїназам (ММП). Ця численна родина Zn-вмісних протеолітичних ензимів у нормі відповідає за перебудову позаклітинного матриксу, а при патологіях діє на субстрати в умовах запальної відповіді. Підвищена активність ММП характерна для багатьох хвороб, зокрема, пухлинного росту, артриту, кардіоваскулярних патологій та цукрового діабету [4]. При цьому найбільший інтерес зазвичай викликає підродина желатиназ, до якої відносять ММП-2 та ММП-9, оскільки вони розщеплюють колаген, його де-

натуровану форму – желатин, ламінін, еластин і фібронектин. Із дисфункцією желатиназ, а саме із зростанням концентрації ММП-9 у крові та ММП-2 у склоподібному тілі пов'язують розвиток діабетичних ретинопатій та мікроангіопатій [5]; важливе значення ці ферменти та їх інгібітори мають у порушеннях гоєння ран (особливо нижніх кінцівок), що спостерігається при діабеті. Роль ММП-2 і ММП-9 у розвитку гострих порушень кровопостачання головного мозку ще більш неоднозначна, адже перша ізоформа конститутивно експресується в астроцитах мозку, особливо в місцях контакту з ендотелієм, багато даного ферменту і в цереброспінальній рідині, однак для його активації потрібен комплекс трьох молекул ММП-2, ТІМР-2 та ММП-14.

Беручи до уваги все вищевикладене, метою дослідження було визначити вміст і оцінити наявність у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсульту та інсульту, ускладненим цукровим діабетом 2 типу, активних форм ММП-2 та ММП-9.

Матеріали та методи. Забір крові для біохімічних досліджень здійснювали одразу після потрапляння хворих до Неврологічного відділення Київської міської лікарні № 4. Діагностування ішемічного інсульту виконували загальноновизнаними методами із застосуванням комп'ютерної та/або магнітно-резонансної томографії. Цукровий діабет виявляли за наявністю гіперглікемії натщесерце та попереднім анамнезом. Таким чином було відібрано 45 пацієнтів з ішемічним інсульту та 24 пацієнти з інсульту, що стався на фоні довготривалого цукрового діабету II типу. Усі хворі або їхні родичі добровільно погодилися на участь у клінічному дослідженні та дали письмову згоду на участь у ньому. У дослідженні також взяли участь практично здорові донори ($n = 35$) без тромботичних захворювань в анамнезі, які за статтю та віком відповідали досліджуваній групі пацієнтів. Визначення відносного вмісту ММП-2 та ММП-9 проводили імуноферментним методом [6], використовуючи планшети із сорбційною здатністю для мікропланшеточного спектрофотометру. Плазму крові розводили 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1 : 100 та інкубували при 4° С упродовж ночі. Видалення несорбованого антигену проводили триразовим промиванням лунок 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,1 % твін-20. Для блокування вільних місць зв'язування після інкубації з антигеном використовували 5 % розчин знежиреного молока. Для цього плашку інкубували при 37° С упродовж 60-ти хв. Первинні та вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій фірми виробника, інкубацію проводили за 37° С упродовж 60-ти хв. Візуалізацію реакції проводили використовуючи субстрат для лужної фосфатази (1 мг/мл паранітрофенілфосфату в 10 % діетаноламіні, рН 9,8) за 37°С упродовж 60-ти хв. Оптичне поглинання проб вимірювали за довжин хвиль 405 та 492 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі μ Quant (Quant TM, BioTek Instruments, Inc, USA). Оптичну похибку планшета визначали шляхом віднімання показників при 550 нм від показника при 450 нм. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [7], який базується на здатності білків зв'язуватися із кумасі діамантовим синім G-250. Для визначення концентрації білка до проби додавали 30 % розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактиву, 95 % етанол та 88 % ортофосфорну кислоту за співвідношенням 2 : 1 : 2 та доводили водою до об'єму 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95 % етанолу, 20 мл 88 % ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворю-

валось через 2–5 хв, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл. Наявність у сироватці крові активних форм матриксних металопротеїназ оцінювали методом ензим-електрофорезу в поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату натрію відповідно до методу [8]. Розділяючий гель полімеризували за наявності желатину із розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю становила 15 %, що унеможливило міграцію заполімеризованого у розділяючий гель субстратного білка. Електрофорез проводили в камерах для вертикального препаративного диск-електрофорезу ("BioRad", USA) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 МА для концентруючого та 36 МА для розділяючого гелів. Після закінчення електрофоретичного розділення гелі відмивали у 2,5 % розчині тритону X-100 упродовж години для видалення залишків додецилсульфату натрію. Далі гелі заливали 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl та інкубували впродовж 12 год за 37°C. Після інкубації гелі фіксували у розчині 7,5 % оцтової кислоти та 37,5 % ізопропілового спирту впродовж 10 хв. Виявлення ділянок, які містять білки, здійснювали шляхом забарвлення гелів у розчині, що містив 2,5 % кумасі

діамантового синього G-250, 10 % етанолу, 10 % оцтової кислоти та 15 % ізопропанолу. Гелі фарбували упродовж 15 хв на автоматичному шейкері. Для видалення залишків барвника гелі відмивали кип'ятінням у 2–8 % розчині оцтової кислоти. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Stat Soft Statistica version 7.0 для Windows, аналіз на параметричність – із застосуванням тесту Шапіро – Уїлка. Числові дані подано у вигляді середнього значення зі стандартною похибкою ($M \pm SE$).

Результати та їх обговорення. Одним із наслідків метаболічних порушень під час патогенезу ішемічного інсульту є посилення синтезу та секреції низки ферментів, активація яких за умов порушення у функціонуванні систем контролю їх активності служить вагомим патобіохімічним механізмом розвитку чи прогресування ускладнень, пов'язаних із перебудовами екстрацелюлярного матриксу. У ході проведених досліджень було виявлено статистично значуще зростання вмісту ММП-2 та ММП-9 як порівняно із групою умовно здорових донорів, так і під час порівняння між собою результатів обох дослідних груп (табл. 1). Так, уміст ММП-9 був вищий за значення норми у 1,2 та 1,9 рази, відповідно, у хворих з ішемічним інсультом та пацієнтів, що додатково хворіли ще й на цукровий діабет.

Таблиця 1. Відносний вміст матриксних металопротеїназ у сироватці крові пацієнтів дослідних груп ($M \pm SE$)

Досліджувані групи	Відносний вміст ММП-2, ум. од/мг білка	Відносний вміст ММП-9, ум. од/мг білка
Умовно здорові донори, N = 35	1,54 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,01
Пацієнти з ішемічним інсультом, N = 45	2,23 $\pm$ 0,07*	1,01 $\pm$ 0,05*
Пацієнти з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету II типу, N = 24	3,38 $\pm$ 0,19*,#	1,63 $\pm$ 0,09*,#

* статистично достовірно щодо показника у групі умовно здорових донорів, $p \leq 0,05$;

статистично достовірно стосовно показника у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, $p \leq 0,05$

Одержані результати у цілому узгоджуються з даними, наведеними у літературі, відповідно до яких у перші години після гострої ішемії головного мозку відбувається зростання рівня ММП-9 як безпосередньо у ядрі інфаркту та перинфарктної області, так і у периферійній крові [9]. Підвищений уміст ММП-9 у ділянці інфаркту дозволяє розглядати даний фермент як потенційний маркер ушкодження тканин головного мозку та свідчить про залученість ММП-9 у процес розширення зони інфаркту. В експериментах із застосуванням моноклональних антитіл, системно блокуючих ММП-9, чи інгібіторів даного ферменту, спостерігалось значне зменшення розмірів ділянок інфаркту головного мозку в щурів [10].

Поряд із підвищенням рівня ММП-9 було виявлено зростання вмісту ММП-2, яке було більш вираженим порівняно із показниками для ММП-9. Уміст даного ферменту в сироватці крові хворих перевищував значення контролю у 1,4 рази для пацієнтів з ішемічним інсультом та вдвічі – для пацієнтів з інсультом на фоні цукрового діабету II типу.

З огляду на той факт, що ММП-9 належить до індукцибельних ферментів, рівень експресії яких перебуває під контролем ростових факторів, цитокінів, гормонів та залежить від оксидативного статусу клітини [11], виявлене нами зростання вмісту ММП-9 у сироватці крові пацієнтів обох дослідних груп може бути безпосереднім наслідком підвищення рівня інтерлейкіну-6 і TNF α та посилення транскрипції генів даного ферменту.

Подібний механізм регуляції активності не характерний для ММП-2, промотори генів якої не містять регуляторних послідовностей, необхідних для зв'язування

відповідних транскрипційних факторів. Тому даний фермент, на відміну від більшості матриксних металопротеїназ, належить до конститутивних. Виявлене нами значне зростання вмісту ММП-2 може бути результатом декількох подій, кожна з яких окремо здатна внести вагомий внесок у порушення чітко скоординованого та строго контрольованого балансу між вмістом і активністю ферментів та регуляторів їх активності.

Найбільш вірогідною причиною зростання вмісту ММП-2 видається посилення секреції про ММП-2 та їх подальше перетворення в активну форму за участі позаклітинних протеїназ, аутокаталітичного розщеплення чи дії інших ММП. Так, джерелом ММП-2 за розвитку ішемічного інсульту можуть виступати не лише активовані нейтрофіли та лейкоцити периферійної крові, а й безпосередньо клітини нервової тканини, зокрема, нейрони, астроцити, мікроглія та ендотеліальні клітини [12].

Негативний вплив ММП за розвитку ішемічного інсульту не останньою мірою пов'язаний із їх здатністю розщеплювати компоненти базальної мембрани ендотеліальних клітин судин головного мозку, сприяючи, таким чином, міграції клітин через гематоенцифалічний бар'єр. Експериментально доведено існування зв'язку між вираженістю пошкодження гематоенцифалічного бар'єру при ішемії та рівнем активації ММП-9. У ділянках із підвищеним умістом ММП-9 зафіксовано найвищу нейтрофілну інфільтрацію та геморагію – еритроцитарну екстравазацію [13]. За таких умов, нейтрофіли, що мігрують в ішемізовану ділянку головного мозку із циркулюючої крові, служать додатковим джерелом активованих ММП.

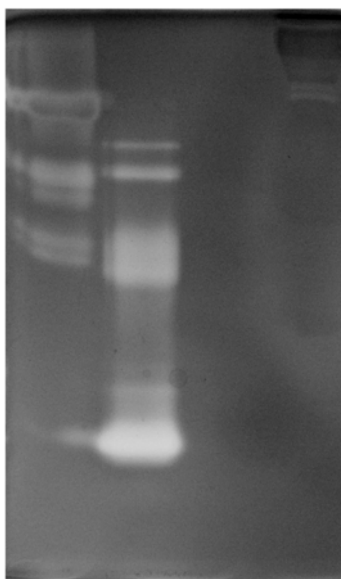
Незважаючи на низку негативних ефектів, обумовлених дією ММП, їхня роль у патогенезі ішемічних ушкоджень не настільки однозначна. Дані ферменти, активно залучаючись у процеси ремоделювання позаклітинного матриксу та міжклітинних взаємодій, здійснюють позитивний вплив на регенерацію пошкоджених тканин. Так, показана участь ММП у постінсультному нейрогенезі. Згідно із дослідженнями Lee S. et al. [14], у мишей із фокальною ішемією головного мозку, ММП-9 сприяє міграції нейробластів із субвентрикулярної зони у ділянку пошкодження.

Значно вищий рівень обох досліджуваних ММП у пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету можна пояснити з огляду на той факт, що більшість хворих із цукровим діабетом страждали ще й на надмірну вагу. А відповідно до досліджень останніх років, адипоцити зростаючої маси жирової тканини активно продукують низку ММП, у тому числі й ММП-2 та -9, які необхідні для забезпечення належних перебудов екстрацелюлярного матриксу під час процесу диференціювання адипоцитів [15]. Більше того, пригнічення активності ММП при використанні інгібіторів батимастату, каптоприлу чи специфічних до ММП антитіл, свідчить про роль даних ферментів у процесах диференціювання адипоцитів [16].

Оскільки розвиток ішемічного інсульту, зокрема, на ранніх стадіях перебігу захворювання та патогенез цукрового діабету, особливо ускладнений супутнім ожирінням, характеризуються активізацією вільнорадикальних реакцій та розвитком оксидативного стресу, можемо припустити, що один із механізмів виявленого нами

зростання вмісту ММП реалізується через індуковану АКМ активізацію МАП-кіназних каскадів та посилення за участі транскрипційних факторів AP-1, NF- κ B, ERK транскрипції генів матриксних металопротеїназ, у тому числі й ММП-9. На додачу, АКМ здатні безпосередньо активувати молекулу ферменту, що було експериментально підтверджено при інкубації про-ММП-9 та про-ММП-2 у системі ксантин/ксантинооксидаза [17]. Подібний ефект АКМ, як вважають, пов'язаний із окисненням сульфгідрильної групи, що входить до складу висококонсервативної пептидної послідовності PRCGXPDV, так званого "цистеїнового вимикача". Цей вільний залишок цистеїну, утворюючи координаційний зв'язок із атомом цинку в активному центрі ферменту, забезпечує підтримання ферменту в неактивному стані. Порушення такої взаємодії внаслідок окиснення сульфгідрильної групи цистеїну чи вилучення цистеїнового залишку обумовлює аутоактивацію ММП-2 [18]. Аналогічний ефект спостерігається і при S-глутатіонілюванні цистеїнового залишку. Зазначимо, що за даних умов утворюється активна форма ферменту з молекулярною масою 72 кДа, у той час як активація за дії протеїназ супроводжується появою 64 кДа ММП-2.

Для оцінки присутності протеолітично активних форм ММП було проведено ензим-електрофоретичний аналіз зразків сироватки крові пацієнтів дослідних груп. Як видно із наведених електрофореграм (рис. 1, 2), певна протеолітична активність наявна як у групах пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету II типу, так і у групі умовно здорових донорів.



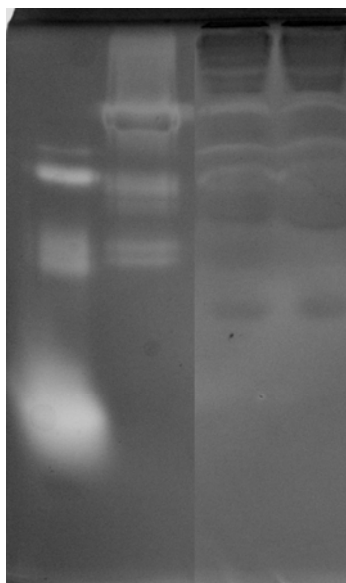
М 1

Рис. 1. Типова ензим-електрофореграма зразків плазми крові умовно здорових донорів (1):
М – маркери молекулярних мас (86 кДа плазмін, 36 кДа міні-плазмін, 23 кДа трипсин)

Незважаючи на те, що обидва дослідні патологічні стани характеризуються подібним розподілом зон із протеолітичною активністю, інтенсивність смуг у зразках сироватки крові хворих на діабет є дещо вищою. У цілому, такі дані узгоджуються із наведеними нами раніше результатами щодо визначення вмісту матриксних металопротеїназ та свідчать про порушення механізмів контролю активності даних ферментів.

Відповідно до даних ензим-електрофорезу, гострий період інсульту, незалежно від наявності в анамнезі

цукрового діабету, характеризується присутністю латентних та активованих форм обох досліджуваних металопротеїназ (рис. 2). Так, наявні смуги протеолітичної активності, що за молекулярною масою відповідають про-ММП-9 (92 кДа) та ММП-9 (85 кДа). Аналогічна картина спостерігається і у випадку ММП-2 – сироватка крові пацієнтів з ішемічним інсультом окремо та інсультом на фоні цукрового діабету містить 72 кДа про-ММП-2 та активовану ММП-2, молекулярна маса якої становить 67 кДа.



M 1 2

Рис. 2. Типова ензим-електрофореграма зразків плазми крові пацієнтів з ішемічним інсультом (1) та інсультом на фоні цукрового діабету II типу (2): М – маркери молекулярних мас (86 кДа плазмін, 36 кДа міні-плазмін, 23 кДа трипсин)

У цілому, високий рівень активованих ММП у сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом на фоні цукрового діабету II типу, опосередковано може свідчити про існування потенційної загрози виникнення повторних ускладнень, спричинених розривом атеросклерозних бляшок. Згідно з існуючими уявленнями, ММП, діючи на волокна колагену та еластину, що входять до складу фіброзної оболонки бляшки, призводять до її розм'якшення та зниження механічної стійкості до розриву. Особливо висока активність ММП-9 виявляється у "плечевій" зоні бляшки, яка є найуразливішою до розривів.

Незважаючи на той факт, що сироватка крові здорових людей також містить латентні форми деяких ММП, що можуть виявляти незначну активність і за умов фізіологічної норми, поява у кровотоці активованих форм даних ферментів є однозначним свідченням порушення тонкої рівноваги між умістом інгібіторів та ММП. За таких умов активація ММП є не лише опосередкованим підтвердженням змін, асоційованих із ремоделюванням позаклітинного матриксу, а й з огляду на здатність даних ферментів розщеплювати низку нематриксних білків, може бути одним із чинників, які сприяють розвитку ускладнень, супутніх основному захворюванню.

Також у зразках сироватки крові пацієнтів було виявлено низку смуг із молекулярною масою вище 100 кДа. Можемо припустити, що протеолітична активність в області локалізації високомолекулярних білків може бути обумовлена активністю про-ММП-9 у складі стабільного комплексу із ТІМП-1 (молекулярна маса близько 116 кДа) чи бути результатом утворення за даних патологічних станів гомодимерів про-ММП-9 (молекулярна маса близько 220 кДа). Накопичення останніх, через відсутність доступних для інгібіторів центрів зв'язування, сприятиме збереженню певного пулу протеолітично активних ММП навіть у випадку відновлення інгібіторно-активаторного балансу.

Виявлена нами наявність активованих форм ММП може бути безпосереднім наслідком порушення механізмів контролю активності даних ферментів. Оскільки активність усіх представників ММП детермінується на рівні їхньої взаємодії із тканинними інгібіторами (ТІМП),

зростання вмісту даних ферментів за відсутності узгодженості у зростанні вмісту їх інгібіторів створюватиме передумови для активації ММП.

Відомо, що активація ММП секреторного типу, зокрема, ММП-2 та ММП-9, відбувається лише після їх вивільнення у позаклітинний простір і здійснюється за участі низки тканинних і плазмених протеїназ, частина яких належить до фібринолітичної ланки системи гемостазу. Так, зокрема, ефективним регулятором активності ММП є плазмін та урокіназа. Зростання концентрації активаторів плазміногену тканинного й урокіназного типів, а також зниження концентрації інгібіторів активаторів плазміногену через вплив на кількість функціонально активного плазміну, опосередковано сприяє перетворенню про-ММП в активну форму. Більше того, згідно із працями Wang X. et al., тканинний активатор плазміногену здатен безпосередньо активувати молекулу проММП-9 [19].

Оскільки ММП-2, на відміну від решти секреторних ММП, є субстратом для дії ММП мембранного типу, вірогідною причиною виявленої нами активації ММП-2 може бути посилення секреції даних ферментів за обох дослідних патологічних станів. У подальшому, діючи на молекули проММП-1, -2, -9, -13, ММП-2 обумовлює каскадоподібний механізм активації решти матриксних металопротеїназ, що у кінцевому результаті призводить до ампліфікації первинного сигналу та значного посилення протеолітичних реакцій, опосередкованих ферментами даної групи.

Таким чином, результати проведених досліджень щодо визначення вмісту та активності матриксних металопротеїназ свідчать, що одним із патогенетичних механізмів, який лежить в основі розвитку ускладнень, спричинених гострою ішемією головного мозку, реалізується за участі ММП-2 та ММП-9. З іншого боку, зростання вмісту активованих форм даних ферментів у хворих із цукровим діабетом не лише сприяє прогресуванню ускладнень, асоційованих із перебудовами позаклітинного матриксу, а й може бути пусковим фактором ескалації атеротромботичних порушень.

Список використаної літератури:

1. Pandey A. Type 2 diabetes: Current understanding and future perspectives / Ankita Pandey, Sheetal Chawla, Prasenjit Guchhait // IUBMB Life. – 2015. – 67(7). – P. 506–513.
2. Castillo J. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice // J. Castillo, I. Rodríguez // Cerebrovasc Dis. – 2004. – 1. – P. 7–18.
3. Derosa G. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients / G. Derosa, I. Ferrari, A. D'Angelo and others // Endothelium. – 2008. – 15(4). – P. 219–224.
4. Malesmud C. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview / C. J. Malesmud // Front Biosci. – 2006. – 11. – P. 1696–1701.
5. Caird J. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms / J. Caird, C. Napoli, C. Taggart et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms // Eur J Neurol. – 2006. 13(10):1098–1105.
6. Crowther J. ELISA. Theory and practice / J. R. Crowther. – N. Y. : Humana Press., 1995. – P. 38–39.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200.
8. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of hemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2011. – 2(1). – P. 20–26.
9. Egashira Y. White Matter Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Role of Blood-Brain Barrier Disruption and Matrix Metalloproteinase-9 / Y. Egashira, H. Zhao, Y. Hua, R. F. Keep and others // Stroke. – 2015. – 46(10). – P. 2909–2915.
10. Romanic A. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size / A. M. Romanic, R. F. White, A. J. Arleth and others // Stroke. – 1998. – 5. – P. 1020–1030.
11. Siwik D. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium / D. A. Siwik, W. S. Colucci // Heart Fail Rev. – 2004. – 9(1). – P. 43–51.
12. Zhao B. Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice / B. Q. Zhao, Y. Ikeda, H. Ihara and others // Blood. – 2004. – 103. – P. 2610–2616.
13. Rosell A. Mmp-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type iv collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke / A. Rosell, E. Cuadrado, A. Ortega-Aznar // Stroke. – 2008. – 39. – P. 1121–1126.
14. Lee S. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke / S. R. Lee, H. Y. Kim, J. Rogowska and others // J. Neurosci. – 2006. – 26. – P. 3491–3495.
15. Bouloumié A. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Involvement in Adipose Differentiation / A. Bouloumié, C. Sengenès, G. Portolan and others // Diabetes. – 2001. – 50(9). – P. 2080–2086.
16. Bourlier V. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation / V. Bourlier, A. Zakaroff-Girard, S. De Barros and others // J. Pharmacol Exp Ther. – 2005. – 312(3). – P. 1272–1279.
17. Rajagopalan S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability / S. Rajagopalan, X. P. Meng, S. Ramasamy and others // J. Clin. Invest. – 1996. – 98. – P. 2572–2579.
18. Park A. Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch" / A. J. Park, L. M. Matrisian, A. F. Kells and others // J Biol Chem. – 1991. – 266(3). – P. 1584–1590.
19. Wang X. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator / X. Wang, S. R. Lee, K. Arai // Nat Med. – 2003. – 9. – P. 1313–1317.
20. Castillo J., Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice // Cerebrovasc Dis. – 2004. – 1. – P. 7–18.
21. Derosa G., Ferrari I., D'Angelo A., Tinelli C., Salvadeo S.A., Ciccarelli L., Piccinini M.N., Gravina A., Ramondetti F., Maffioli P., Cicero A.F. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients // Endothelium. – 2008. – 15(4). – P. 219–224.
22. Malesmud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview // Front Biosci. – 2006. – 11. – P. 1696–1701.
23. Caird J., Napoli C., Taggart C., Farrell M., Bouchier-Hayes D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms // Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms // Eur J Neurol. 2006;13(10):1098–1105.
24. Crowther J. ELISA. Theory and practice / New York: Humana Press., 1995. – P. 38–39.
25. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 86. – P. 193–200.
26. Ostapchenko L., Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of hemostasis system // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2011. – 2(1). – P. 20–26.
27. Egashira Y., Zhao H., Hua Y., Keep R.F., Xi G. White Matter Injury After Subarachnoid Hemorrhage: Role of Blood-Brain Barrier Disruption and Matrix Metalloproteinase-9 // Stroke. – 2015. – 46(10). – P. 2909–2915.
28. Romanic A., White R., Arleth A., Ohlstein E., Barone F. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size // Stroke. – 1998. – 5. – P. 1020–1030.
29. Siwik D., Colucci W. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium // Heart Fail Rev. – 2004. – 9(1). – P. 43–51.
30. Zhao B., Ikeda Y., Ihara H., Urano T., Fan W., Mikawa S., Suzuki Y., Kondo K., Sato K., Nagai N., Umemura K. Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloproteinase 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice // Blood. – 2004. – 103. – P. 2610–2616.
31. Rosell A., Cuadrado E., Ortega-Aznar A. Mmp-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type iv collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke // Stroke. – 2008. – 39. – P. 1121–1126.
32. Lee S., Kim H., Rogowska J., Zhao B., Bhidé P., Parent J., Lo E. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke // J Neurosci. – 2006. – 26. – P. 3491–3495.
33. Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G., Galitzky J., Lafontan M. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Involvement in Adipose Differentiation // Diabetes. – 2001. – 50(9). – P. 2080–2086.
34. Bourlier V., Zakaroff-Girard A., De Barros S., Pizzacalla C., de Saint Front V.D., Lafontan M., Bouloumié A., Galitzky J. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation // J Pharmacol Exp Ther. – 2005. – 312(3). – P. 1272–1279.
35. Rajagopalan S., Meng X., Ramasamy S., Harrison D., Galis Z. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability // J. Clin. Invest. – 1996. – 98. – P. 2572–2579.
36. Park A., Matrisian L., Kells A., Pearson R., Yuan Z., Navre M. Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch" // J Biol Chem. – 1991. – 266(3). – P. 1584–1590.
37. Wang X., Lee S., Arai K., Lee S., Tsuji K., Rebeck G., Lo E. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator // Nat Med. – 2003. – 9. – P. 1313–1317.

References (Scopus)

1. Pandey A. Type 2 diabetes: Current understanding and future perspectives / Ankita Pandey, Sheetal Chawla, Prasenjit Guchhait // IUBMB Life. – 2015. – 67(7). – P. 506–513.

Т. Царенко, асп., Н. Ракша, канд. биол. наук, О. Кравченко, канд. биол. наук,
УНЦ "Інститут біології і медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА, ОТЯГОЩЕННОГО САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

Матричные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать компоненты внеклеточного матрикса. Класс металлопротеиназ-желатиназы, который включает желатиназу А или ММП-2 (72 кДа) и желатиназу В или ММП-9 (92 кДа), играет исключительно важную роль в патогенезе ряда острых и хронических патологических процессов, в частности, сердечно-сосудистых заболеваний. Определение особенностей функционирования и регуляции матриксных металлопротеиназ при различных заболеваниях позволит не только расширить представления об их патогенезе, но также обосновать

Received in the editorial 03.04.2018
Received a revised version on 11.05.2018
Signed in the press on 11.05.2018

вать и внедрить в практическую медицину новые методы диагностики и лечения. В настоящем исследовании было проанализировано содержание, а также наличие активных форм MMP-9 и MMP-2 в сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом и ишемическим инсультом, осложненным сахарным диабетом II типа. Установлено, что острая фаза ишемического инсульта сопровождается значительным изменением содержания исследуемых металлопротеиназ в сыворотке крови пациентов обеих групп. У пациентов с ишемическим инсультом, анамнез которыхотягощен наличием сахарного диабета II типа, изменения содержания MMP-2 и MMP-9 и их активности были более выраженными в сравнении с результатами пациентов только с ишемическим инсультом. Согласно данным энзим-электрофореза для острого периода инсульта, независимо от наличия в анамнезе сахарного диабета, характерно присутствие в сыворотке крови латентных и активированных форм обеих исследуемых металлопротеиназ. Так, четко видны полосы протеолитической активности, которые по молекулярной массе соответствуют про-MMP-9 (92 кДа) и MMP-9 (85 кДа). Аналогичная картина наблюдается и в случае MMP-2 – сыворотка крови пациентов с ишемическим инсультом отдельно и инсультом на фоне сахарного диабета содержит 72 кДа про-MMP-2 и активированную MMP-2, молекулярная масса которой составляет 67 кДа.

Ключевые слова: ишемический инсульт, сахарный диабет II типа, матриксные металлопротеиназы.

T. Tsarenko, PhD student, N. Raksha, PhD., O. Kravchenko, PhD.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE DEVELOPMENT OF ISCHEMIC STROKE OF THE PATIENTS WITH OR WITHOUT DIABETES MELLITUS II TYPE

Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of zinc-dependent endopeptidases, capable of degrading all the molecular components of extracellular matrix. A class of metalloproteinases–gelatinases, which includes gelatinase A or MMP-2 (72 kDa) and gelatinase B or MMP-9 (92 kDa) has been shown to play critical roles in a number of acute and chronic pathological processes, in particular, cardiovascular diseases. For these reasons gelatinases obtained a great interest as potential non-invasive biomarkers in providing useful clinical information in stroke diagnosis and therapy. In present study we have analyzed the content of MMP-9 and MMP-2 in serum samples of patients with ischemic stroke alone and ischemic stroke complicated by diabetes mellitus type II, as well as the enzymatic activities presented in blood serum. It has been established that the acute phase of ischemic stroke is accompanied by the significant change of the content of investigated metalloproteinases in the blood serum. The obtained results demonstrated that blood serum content of MMP-2 is significantly higher than content of MMP-9. The changes of the content of MMP-2 and MMP-9 were more pronounced in the group of patients with ischemic stroke and diabetes mellitus type 2 comparing with the results of patients with ischemic stroke alone. For analysis of forms of gelatinases the gelatine zymography technique was applied. This is a sensitive and simple method which allows to measure the relative amounts of active and inactive enzymes in body fluids and tissue extracts. The serum samples patients with stroke alone and complicated by diabetes contained two prominent gelatinolytic bands corresponding to monomeric proMMP-9 (92 kDa), proMMP-2 (72 kDa) active MMP-9 (85 kDa), MMP-2 (67 kDa) and some additional bands migrating above 100 kDa. By contrast, the healthy serum samples displayed only the 92 and 72 kDa proforms.

Keywords: ischemic stroke, diabetes mellitus type II, matrix metalloproteinases.